

(19) Korean Intellectual Property Office

(12) Laid-open Patent Gazette

(11) Korean Laid-open Patent Publication No. 2003-0045611

5 (43) Publication Date: June 11, 2003

(21) Korean Application Number: 10-2002-0075787

(22) Filing Date: December 2, 2002

10 (30) Priority Claim: KR10-2001-0076213 filed on December 4, 2001

(71) Applicant: SAMYANG Corporation

263, Yeongji-dong, Jongro-gu, Seoul 110-725, Republic of Korea

(72) Inventors: SEO Min-Hyo; LEE-Sa-Won; HYUN, Myoung-Han; and YOO-Jung-Il

15

(54) Polymeric composition forming stable polymeric micelles or nanoparticles in stable aqueous solutions

20 **[Abstract of Disclosure]**

The present invention relates to polymeric composition forming stable polymeric micelles or nanoparticles in stable aqueous solutions, and more specifically to polymeric compositions forming stable polymeric micelles or nanoparticles in stable aqueous solutions comprising an amphiphilic block copolymer of a hydrophilic block and a hydrophobic block, wherein one terminal carboxylic group of the polylactic acid derivative is fixed with a di- or tri-valent metal ion. The compositions of the present invention can form stable polymeric micelles or nanoparticles in body fluids or aqueous solutions. The micelles or nanoparticles formed from the compositions of the present invention have a hydrophilic outer shell and a hydrophobic inner core wherein a large amount of

25

hydrophobic drug can be physically trapped. The drug containing micelles and nanoparticles of the present invention have a prolonged retention time in the bloodstream after administration, and can be utilized to make various pharmaceutical formulations.

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl. 7
C08G 63/06(11) 공개번호 특2003-0045611
(43) 공개일자 2003년06월11일(21) 출원번호 10-2002-0075787
(22) 출원일자 2002년12월02일

(30) 우선권주장 1020010076213 2001년12월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인 주식회사 삼양사
서울 종로구 연지동 263번지(72) 발명자 서민호
대전광역시서구둔산2동909번지수정타운2-1008
이사원
대전광역시유성구신성동대림두레아파트103동1201호
현명한
서울특별시영등포구신길6동우성아파트206동501호
유정일
서울특별시관악구봉천7동1622-14

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) 수용액에서 안정한 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는고분자 조성물

요약

본 발명은 수용액에서 안정한 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는 고분자 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체 및 카르복시산 말단기를 함유하는 폴리락트산 유도체를 포함하고, 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정되어 수용액에서 안정된 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는 고분자 조성물에 관한 것으로, 상기 고분자 조성물은 수용액 또는 체액에서 안정한 고분자 미셀 및 나노 파티클을 형성하고, 상기 형성된 고분자 미셀 또는 나노 파티클 내에 난용성 약물을 다량 함유할 수 있으며, 혈액 내에서 장기간 체류할 수 있어, 다양한 용도의 의약제제로 이용이 가능하다.

대표도

도 1

색인어

고분자 나노파티클, 고분자 미셀, 양친성 블록 공중합체, 폴리락트산, 금속 이온

명세서

• 도면의 간단한 설명

도 1 은 본 발명의 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 고정된 고분자 나노파티클을 나타낸 도면이며,

도 2 는 본 발명의 난용성 약물을 미셀내의 소수성 코어 내에 함유한 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 고정된 고분자 나노파티클의 모형도를 나타낸 것이며,

도 3 은 본 발명의 약물을 함유한 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 고정된 고분자 나노파티클을 투여후에 혈중 약물 농도의 변화를 시간에 따라 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 고정된 고분자 나노파티클, 크레모포어 EL과 트윈80에 대한 혈중농도 프로파일을 각각 나타낸 그래프이다.

도 5a 는 본 발명의 약물을 함유한 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 고정된 고분자 나노파티클을 인간 전립선암 셀라인 PPC-1을 사용한 쥐에 주입하여 항암효과를 나타낸 그래프이다.

도 5b 는 본 발명의 약물을 함유한 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 고정된 고분자 나노파티클을 인간 대장암 셀라인 HT-29을 사용한 쥐에 주입하여 항암효과를 나타낸 그래프이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 수용액에서 안정한 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는 고분자 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체 및 카르복시산 말단기를 함유하는 폴리락트산 유도체를 포함하고, 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정되어 수용액에서 미셀 또는 나노파티클의 안정성이 향상된 것을 특징으로 하는 고분자 조성물에 관한 것이다.

약물의 정맥투여를 위하여 생분해성 고분자를 이용한 초미립자 약물전달 시스템(submicronic particulate drug delivery system)이 연구되고 있다. 최근에는 생분해성 고분자를 이용한 극소립자 시스템(nanoparticle system) 및 고분자 미셀 시스템(polymeric micelle system)이 정맥투여에 의해 투여된 약물의 체내 분포를 변경하여 부작용을 경감시키고, 효능이 향상된 유용한 기술이라고 보고되고 있으며, 이러한 시스템은 약물의 표적화가 가능하여 목표로 하는 기관, 조직 또는 세포에 약물의 방출을 조절한다. 실제로 이러한 시스템은 체액과 적합성이 우수하고, 난용성 약물의 가용화 능력 및 약물의 생체내 이용률(bioavailability)을 향상시킨다고 보고되고 있다.

최근 친수성 부분과 소수성 부분으로 구성된 블록 공중합체에 약물을 화학적으로 결합하여 블록 공중합체 미셀을 제조하는 방법이 보고되었다[JP 116,082/89; EP 0 583 955 A2; JP 206,815/94].

블록 공중합체는 친수성 부분(A)으로 폴리에틸렌옥사이드를 사용하고, 소수성 부분(B)으로 폴리아미노산류 또는 폴리아미노산류에 소수성기를 결합시킨 것을 사용하여 중합된 A-B형 이중 블록 공중합체를 보고하였다. 상기 블록 공중합체에 의해 형성된 고분자 미셀의 코어(core)에 아드리아마이신(adriamycin) 또는 인도메타신(indomethacin) 등 약물을 물리적으로 봉입시켜 약물전달체로 사용할 수 있다. 그러나, 상기 블록 공중합체에 의해 형성된 고분자 미셀은 생체내 분해가 어려우며, 상기 블록 공중합체의 생체적합성이 떨어져 생체내 사용시에는 여러 가지 문제가 야기된다.

또한, 생분해성 및 생체적합성이 우수하며, 난용성 약물을 봉입하여 안정하고 효능이 증강된 최적의 코어-셸(core-shell)형 약물 전달체를 개발하려는 노력이 이루어지고 있다.

유럽특허 제 0 552 802 A2호에서는 코어-셸형 고분자로, 셸(shell)로 친수성인 폴리에틸렌옥사이드를 사용하고, 코어(core)로 소수성인 생분해성 고분자를 사용하여 수용액 상에서 가교결합(crosslinking)을 형성하여 화학적으로 고정된 고분자 미셀의 제조방법을 보고하였다. 그러나, 상기 방법은 연속상인 물에서 코어를 구성하는 고분자가 가교결합을 통해 안정한 구조를 이루기 위해서는 A-B 또는 A-B-A형의 이중 또는 삼중 블록 공중합체의 소수성 부분에 가교결합 물질(crosslinker)을 도입하여야 하는 제조상의 어려움이 있으며, 이들 가교결합 물질들은 인체에 적용한 예가 없어 안전성이 확보되지 않았다는 문제점이 있다.

한편, 약물의 가용화 기술로서, 친수성 고분자로 폴리알킬렌글리콜 유도체와 소수성 고분자로 생분해성을 나타내는 지방산 폴리에스테르 또는 폴리아미노산 등의 이중 또는 삼중 블록 공중합체로 이루어진 고분자 미셀을 이용한 방법이 보고되었다.

미합중국특허 제 5,449,513호는 친수성 고분자로 폴리에틸렌글리콜을 사용하고, 소수성 고분자로 폴리벤질 아스파르트산 등의 폴리아미노산 유도체를 사용하여 제조한 이중 블록 공중합체를 보고하였다. 상기 이중 블록 공중합체는 소수성 항암제인 독소루비신 또는 소염 진통제인 인도메타신을 가용화시킬 수 있으나, 상기 폴리아미노산 유도체는 생체내에서 가수분해되지 않고 효소에 의해서만 분해되며, 면역반응을 일으키는 등의 단점이 있다.

미합중국특허 제 5,429,826호는 친수성 고분자인 폴리알킬렌글리콜과 소수성 고분자인 폴리락트산으로 이루어진 이중 또는 다중 블록 공중합체를 보고하였다. 구체적으로, 상기 이중 또는 다중 블록 공중합체의 말단기에 아크릴산 유도체를 결합시킨 공중합체를 수용액에서 고분자 미셀화시킨 다음 가교 결합시켜 고분자 미셀을 안정화시키는 방법을 보고하였다. 그러나, 상기 방법은 고분자 미셀의 안정화는 이룰 수 있었으나, 가교 결합된 고분자가 분해되지 않아 생체내에서의 이용이 불가능하다.

국내특허 제 2001-64164호는 특정한 분자량의 폴리락트산 유도체가 중성의 pH 수용액에서 고분자 미셀을 형성하여 난용성 약물을 가용화시키는 것이 개시되었다. 그러나, 상기 고분자 미셀이 중성의 pH 수용액에서 다량의 난용성 약물을 가용화시킬 수 있는 반면, 인체와 동일한 온도(37℃)의 수용액에서 단시간 내에 약물이 방출되어 안정성이 떨어지는 단점이 있다.

또한, 국내특허 제 2001-64468호는 상기 특정한 분자량의 폴리락트산 유도체와 친수성 블록과 소수성 블록으로 이루어진 양친성 블록 공중합체의 조성물로 제조한 고분자 미셀로 다량의 약물을 가용화시킬 수 있으며, 수용액에서의 안정성이 우수한 고분자 미셀 조성물을 개시하였다.

이에, 본 발명자들은 중래 미셀을 형성하는 고분자 조성물에 비해 안정성이 더욱 향상된 고분자 조성물을 제조하기 위해, 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체와 카르복시산 말단기를 함유하는 폴리락트산 유도체를 포함하는 고분자 조성물에 금속 양이온을 첨가하면 수용액 상에서 안정하고 극히 미세한 고분자 미셀 또는 나노파티클이 형성되고, 상기 형성된 고분자 미셀 또는 나노파티클 내부에 다량의 난용성 약물을 봉입시킬 수 있으며, 또한 혈액 내에서 장기간 체류할 수 있음을 알아내어 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 입자가 매우 미세하며, 다량의 난용성 약물을 가용화시키며, 수용액 또는 체액에서 안정성이 우수한 고분자 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는 고분자 조성물을 제공하는 것이다.

구체적으로, 본 발명의 목적은 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체 및 카르복시산 말단기를 함유하는 폴리락트산 유도체를 포함하고, 상기 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정된 고분자 조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 고분자 조성물에 의해 형성된 고분자 미셀 또는 나노 파티클 조성물 내부에 난용성 약물이 봉입된 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 약학적 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여,

본 발명은 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체 및

카르복시산 말단기를 함유하는 폴리락트산 유도체를 포함하고, 상기 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정된 고분자 조성물을 제공한다.

본 발명은 상기 고분자 조성물에 의해 형성된 고분자 미셀 또는 나노 파티클 조성물 내부에 난용성 약물이 봉입된 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 고분자 조성물의 제조방법을 제공한다.

이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

본 발명은 친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체 및

카르복시산 말단기를 함유하는 폴리락트산 유도체를 포함하고, 상기 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정된 수용액에서 안정한 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는 고분자 조성물을 포함한다.

본 발명의 양친성 블록 공중합체는 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)이 A-B 형태로 연결된 이종 블록 공중합체이며, 비이온성인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 양친성 블록 공중합체는 수용액 상에서 소수성 블록(B)이 코어(core)를 형성하고, 친수성 블록(A)이 셸(shell)을 형성하는 코어-셸(core-shell) 형태의 고분자 미셀을 형성한다.

상기 양친성 블록 공중합체의 친수성 블록(A)은 수용성인 성질을 가진 고분자로서, 구체적으로 폴리알킬렌글리콜(polyalkyleneglycol) 또는 그 유도체, 폴리비닐알코올(polyvinylalcohol), 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone) 또는 폴리 아크릴아마이드(polyacrylamide) 등이며, 바람직하게는 모노메톡시폴리알킬렌글리콜(monomethoxypolyalkyleneglycol), 모노아세톡시폴리에틸렌글리콜(monoacetoxypolyethyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol), 폴리에틸렌-co-프로필렌글리콜(polyethylene-co-propyleneglycol) 및 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolindone)으로 이루어진 그룹 중 선택된 것이다.

또한, 상기 친수성 블록(A)은 중량평균 분자량 500~50,000 달톤인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 중량평균 분자량 1,000~20,000 달톤 이다.

본 발명의 양친성 블록 공중합체의 소수성 블록(B)은 물에 녹지 않으며, 생체적합성이 우수하고, 생분해성인 고분자를 포함한다. 구체적으로 폴리에스테르(polyester), 폴리안하이드라이드(polyanhydride), 폴리아미노산(polyamino acid), 폴리오르소에스테르(polyorthoester) 또는 폴리포스파진(polyphosphazine) 등이 있으며, 바람직하게는 폴리락타이드(polylactide), 폴리글리콜라이드(polyglycolide), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리다이옥산-2-온(polydioxan-2-one), 폴리락틱-co-글리콜라이드(polylactic-co-glycolide), 폴리락틱-co-다이옥산-2-온(polylactic-co-dioxane-2-one), 폴리락틱-co-카프로락톤(polylactic-co-caprolactone) 및 폴리글리콜릭-co-카프로락톤(polyglycolic-co-caprolactone)으로 이루어진 그룹 중 선택된 것이다. 상기 소수성 블록(B)의 카르복시 말단은 지방산 기로 치환될 수 있다.

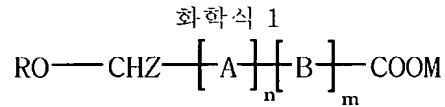
상기 양친성 블록 공중합체의 소수성 블록(B)은 중량평균 분자량이 500~50,000 달톤이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1,000~20,000 달톤이다.

본 발명에 따른 양친성 블록 공중합체는 수용액 상에서 안정한 고분자 미셀을 형성하기 위하여 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)의 조성비는 친수성 블록(A):소수성 블록(B)에 대해 2:8~8:2이며, 바람직하게는 4:6~7:3이다. 친수성 블록(A)이 상기 범위 미만인 경우, 고분자는 수용액에서 고분자 미셀을 형성하지 않으며, 상기 범위를 초과한 경우, 고분자는 고분자 미셀을 형성하지만 친수성이 너무 높아서 안정성이 매우 떨어지게 된다.

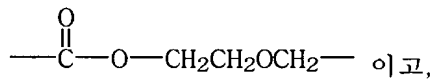
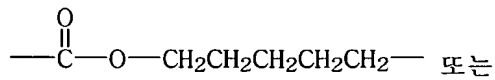
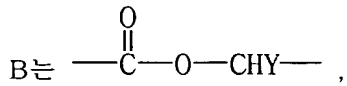
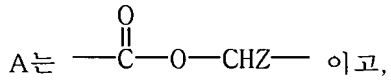
또한, 상기 폴리락트산 유도체는 한쪽 말단이 반드시 하나 이상의 카르복시산기 또는 카르복시산 염을 포함하며, 다른 말단기는 히드록시(hydroxy), 아세톡시(acetoxy), 벤조일옥시(benzoyloxy) 데카노옥시(decenoxy), 팔미토옥시(palmitoxy) 및 알콕시(alkoxy)로 이루어진 그룹 중 선택된 하나로 이루어져 있으며, 상기 카르복시산기 또는 카르복시산 염기는 pH 4 이상의 수용액에서 친수성기로 작용하여 수용액에서 고분자 미셀을 형성한다.

상기 폴리락트산 유도체가 수용액 내에서 미셀을 형성하기 위해서, 수용액에 용해 후 폴리락트산 분자 내 존재하는 친수성 및 소수성기가 균형을 이루어 미셀이 형성된다. 그 결과, 소수성을 나타내는 에스테르 부분의 분자량이 커지면 말단의 카르복시산 음이온끼리의 회합이 어려워 미셀 형성이 잘 이루어질 수 없다. 이에, pH 4 이상에서 미셀을 형성할 수 있는 적절한 수평균 분자량은 500~2,500 달톤으로, 분자량이 너무 적게 되면 물에 완전히 용해되어 미셀 형성 자체가 어렵고, 분자량이 2,500 달톤 이상이면 상기한 이유로 미셀 형성이 어렵다. 또한, 분자량이 높을수록 수용액에서 용해조차 어려워 미셀을 형성할 수 없게 된다. 이러한 폴리락트산 유도체의 분자량은 제조시 반응온도 및 시간 등을 적절히 조절하여 이를 수 있다.

상기 폴리락트산 유도체는 바람직하게 하기 화학식 1로 나타낸다.



(상기 식에서,



R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸 또는 에틸기이며,

Z 및 Y는 수소, 메틸기 또는 페닐기이며,

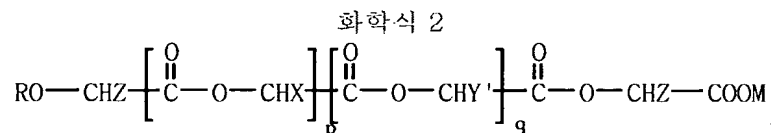
M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이며,

n은 1~30의 정수이며,

m은 0~20의 정수이다.)

상기 폴리락트산 유도체는 한쪽 말단에 카르복시산기 또는 카르복시산 알칼리금속염을 가지며, 바람직하게는 카르복시산 알칼리금속염을 가진다. 상기 카르복시산 알칼리금속염은 나트륨, 칼륨 또는 리튬의 1가 금속이온인 금속 이온 염 형태의 폴리락트산 유도체를 형성하며, 실온에서 고체 상태로 존재하며, 공기 중의 수분에 노출되어도 pH가 중성이므로 매우 안정한 형태를 띤다

더욱 바람직하게, 상기 폴리락트산 유도체는 하기 화학식 2로 나타낸다.



(상기 식에서,

X는 메틸기이며,

Y'는 수소 또는 페닐기이며,

p는 0~25의 정수이며,

q는 0~25의 정수이며,

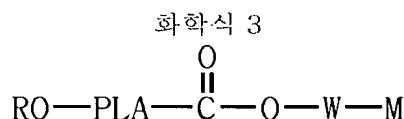
단, p+q는 5~25의 정수이며,

R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸 또는 에틸기이며,

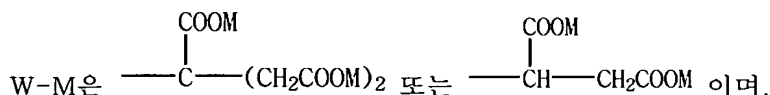
Z 및 Y는 수소, 메틸기 또는 페닐기이며,

M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이다.)

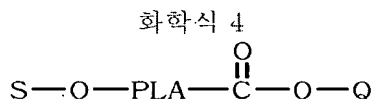
또한, 말단기 중의 하나에 하나 이상의 카르복시산 또는 카르복시산 염을 갖는 화학식 3 및 4의 폴리락트산 유도체도 본 발명에 적용가능하다.



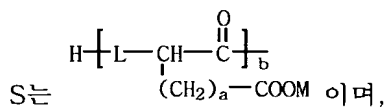
(상기 식에서,



PLA는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어지는 그룹에서 선택되는 어느 하나이며, R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸 또는 에틸기이며, M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이다.)



(상기식에서,



L은 -NR₁- 또는 -O-이며,

R₁은 수소 또는 C₁~C₁₀의 알킬이며,

Q는 CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₂CH₃ 또는 CH₂C₆H₅이며,

M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이며,

a는 0~4의 정수이며,

b는 1~10의 정수이며,

PLA는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것이다.)

특히, 본 발명은 상기 고분자 미셀 또는 나노 입자가 수용액 상에서의 안정성을 더욱 향상시키기 위하여 금속이온을 포함한다.

본 발명은 도 1 및 도 2 에서 보는 바와 같이, 상기 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산 유도체를 혼합하여 고분자 미셀을 형성한 후 이의 안정성을 더욱 향상시키기 위해 2가 또는 3가 금속이온을 첨가하여 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기와 금속이온이 결합된 고분자 미셀 또는 나노 파티클을 형성한다. 상기 금속이온은 도 1 에서 보는 바와 같이, 안정성이 떨어지는 폴리락트산 유도체를 보완하기 위해, 고분자 미셀 내의 폴리락트산 카르복시 말단기의 1가 금속 양이온과 치환 반응하여 금속이온 결합을 형성한다. 상기 형성된 금속이온 결합은 강한 결합력으로 인해 고분자 미셀 또는 나노 입자를 형성하여, 안정성을 더욱 향상시키는 역할을 한다.

상기 금속이온은 2가 또는 3가의 금속이온이며, 바람직하게는 칼슘(Ca^{2+}), 마그네슘(Mg^{2+}), 바륨(Ba^{2+}), 크롬(Cr^{3+}), 철(Fe^{3+}), 망간(Mn^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 아연(Zn^{2+}) 또는 알루미늄(Al^{3+}) 등에서 선택된다.

상기 금속이온은 황산염, 염산염, 탄산염, 인산염 및 수산화물의 형태로 고분자 미셀 조성물에 첨가시키며, 바람직하게는 염화칼슘(CaCl_2), 염화마그네슘(MgCl_2), 염화아연(ZnCl_2), 염화알루미늄(AlCl_3), 염화철(FeCl_3), 탄산칼슘(CaCO_3), 탄산마그네슘(MgCO_3), 인산칼슘($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 인산마그네슘($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$), 인산알루미늄(AlPO_4), 황산마그네슘(MgSO_4), 수산화칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$), 수산화마그네슘($\text{Mg}(\text{OH})_2$), 수산화알루미늄($\text{Al}(\text{OH})_3$) 또는 수산화아연($\text{Zn}(\text{OH})_2$)을 첨가시킨다.

상기 금속이온은 당량을 조절하여 고분자 미셀 또는 나노 파티클 내부에 봉입되어 있는 약물의 방출 속도를 조절할 수 있다. 구체적으로, 금속이온이 폴리락트산 유도체의 카르복시기의 당량에 대하여 고분자 미셀 조성물에 1 당량 이하 포함되면, 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 적어 약물의 방출 속도가 증가하게 되며, 1 당량 이상 포함되면, 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 많아 약물의 방출 속도가 지연된다. 이에, 혈액 내 약물의 방출속도를 증가시키기 위해 적은 당량의 금속이온을 사용하며, 약물의 방출 속도를 지연시키기 위해서는 많은 당량의 금속이온을 사용할 수 있다.

또한, 금속이온의 첨가되는 당량을 조절하여 고분자 미셀 또는 나노 입자를 구별하여 형성할 수 있다. 구체적으로, 카르복시 말단기의 당량에 대하여 0.5 당량 이하로 2가 금속 양이온을 첨가하면, 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기와 결합되는 수가 부족하게 되어 고분자 미셀의 형태를 갖게 되며, 0.5 당량 이상의 2가 금속 양이온을 처리하면, 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기와 결합할 수 있는 금속 양이온 수가 충분하여 미셀을 더욱 단단히 고정시키기 때문에 나노 파티클의 형태를 갖게 된다.

본 발명의 고분자 미셀 또는 나노 입자를 형성하는 고분자 조성물은 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산 유도체의 총합을 100 중량% 기준하여,

양친성 블록 공중합체 5~95 중량%, 및

폴리락트산 유도체 5~95 중량%로 이루어져 있으며,

또한, 2가 또는 3가 금속이온은 상기 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기의 당량에 대하여 0.01~10 당량으로 이루어진다.

바람직하게는, 양친성 블록 공중합체 20~80 중량%, 및

폴리락트산 유도체 20~80 중량%로 이루어져 있으며,

또한, 2가 또는 3가 금속이온은 상기 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기의 당량에 대하여 0.1~5 당량이며,

더욱 바람직하게는, 양친성 블록 공중합체 10~60 중량%, 및

폴리락트산 유도체 40~90 중량%로 이루어져 있으며,

또한, 2가 또는 3가 금속이온은 상기 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기의 당량에 대하여 0.2~2 당량으로 이루어진다.

본 발명은 상기 고분자 조성물에 의해 형성된 고분자 미셀 또는 나노 파티클 내부에 난용성 약물이 봉입된 약학적 조성물을 포함한다. 본 발명의 고분자 미셀 또는 나노 파티클은 내부에 약물을 봉입할 수 있으며, 이를 이용하여 약물의

• 혈중 농도를 향상시킬 수 있는 다양한 용도의 의약제제로 이용이 가능하다.

도 2 에서 보는 바와 같이, 상기 양친성 블록 공중합체 및 폴리락트산 유도체 에 난용성 약물을 혼합하여 약물이 봉입된 고분자 미셀을 형성하고, 이의 안정성을 더욱 향상시키기 위해 2가 또는 3가 금속이온을 첨가하여 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기와 금속이온을 결합시킴으로써 약물이 봉입된 고분자 미셀 또는 나노 파티클을 형성한다.

난용성 약물을 인체에 경구 또는 비경구로 투여하기 위하여, 본 발명의 고분자 조성물을 이용하여 난용성 약물을 고분자 미셀 또는 나노 파티클 내부에 함유시켜 가용화한다. 난용성 약물이 함유된 고분자 미셀 또는 나노파티클은 체내 투여하면 오랜시간 혈중에 체류하다가 병소에 축적되고, 병소에서 고분자가 생분해되어 난용성 약물이 방출되어 약리효과를 나타내게 된다.

상기 난용성 약물은 물에 대한 용해도가 100 mg/ml 이하인 항암제, 항생제, 소염 진통제, 마취제, 호르몬류, 고혈압 치료제, 당뇨병 치료제, 고지질증 치료제, 항바이러스제, 파킨슨병 치료제, 치매 치료제, 항 구토제, 면역 억제제, 궤양 치료제, 변비 치료제 및 항 말라리아제 등이 있으며, 바람직하게는 인체 투여시 혈액농도 소실 속도가 매우 빠른 약물인 파클리탁셀, 캄토테신, 에토포싸이드, 독소루비신, 다우소루비신, 이다루비신, 아라-C 등의 항암제, 싸이클로스포린 A 등의 면역억제제, 테스토스테론, 에스트라다이올, 에스트로젠, 프로게스테론, 트리암시론 아세테이트, 텍사메타손 등의 스테로이드 호르몬 약물, 테녹시카, 피록시카, 인도메타신, 이부프로펜 및 COX-II 인히비터 등의 소염 진통제가 있다.

상기 혼합 고분자 조성물에 난용성 약물을 가용화시키기 위하여 봉입 가능한 난용성 약물의 함량은 블록 공중합체, 폴리락트산 유도체 및 약물 100 중량부에 대하여 0.1~30 중량%가 바람직하다.

상기 난용성 약물 함유 고분자 미셀의 입자의 크기는 사용하는 고분자의 분자량 및 폴리락트산 유도체와 양친성 블록 공중합체의 조성비에 따라 5~400 nm 로 조절 가능하며, 바람직하게는 10~200 nm로 조절 가능하다.

본 발명의 난용성 약물이 봉입된 고분자 미셀 또는 나노파티클은 안정성이 우수하여 혈중 농도를 향상시킬 수 있다. 하기 실시예 및 도 3 에서 보는 바와 같이, 블록 공중합체만에 의한 파클리탁셀이 봉입된 고분자 미셀(조성 3) 및 블록 공중합체 및 폴리락트산에 의한 파클리탁셀이 봉입된 고분자 미셀(조성 2)에 비해 본 발명의 고분자 조성물에 의한 파클리탁셀이 봉입된 고분자 나노파티클 (조성 1)이 혈액 내에서 더욱 오래 체류할 수 있어, 혈중 농도를 오래 유지시킬 수 있음을 알 수 있다.

본 발명의 고분자 조성물은 난용성 약물을 함유한 고분자 미셀 또는 나노파티클 형태로 제조하여 경구 투여 또는 비경구 투여할 수 있다.

비경구 투여는 난용성 약물을 혈관, 근육, 피하, 복강, 경비, 직장, 눈 또는 폐 등의 경로로 투여하며, 경구 투여는 본 발명의 폴리락트산 유도체에 난용성 약물을 혼합한 후 정제 또는 캡슐 형태, 또는 수용액으로 직접 투여하는 것이 가능하다

또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 제조방법을 포함한다.

구체적으로, 도 2 에서 보는 바와 같이,

양친성 블록 공중합체, 폴리락트산 유도체 및 난용성 약물을 유기 용매에 용해시킨후 유기용매를 증발시키고 얻어진 혼합물을 수용액에 가하여 난용성 약물 함유 고분자 미셀 또는 파티클을 제조하는 단계(단계 1), 및

상기 고분자 미셀에 2가 또는 3가 금속이온을 첨가하여 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기를 고정시키는 단계(단계 2)로 이루어진 제조방법을 포함한다.

단계 1은 일정 비율의 상기 폴리락트산 유도체, 양친성 블록 공중합체 및 난용성 약물을 함께 아세톤, 에탄올, 메탄올, 아세트산 에틸, 아세토니트릴, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 아세트산 및 다이옥산으로 이루어진 그룹 중 하나 또는 그 이상의 혼합 용매에 녹여서 균일한 용액을 제조한 다음, 유기용매를 제거하고, 난용성 약물과 고분자의 균일한 혼합물을 제조한다. 상기 혼합물을 pH 4~8 인 수용액을 가하고, 0~80 ℃에서 난용성 약물 함유 혼합 고분자 수용액을 제조한다.

단계 2는 상기 난용성 약물 함유 혼합 고분자 미셀 수용액에 0.001~2 M 농도의 상기 2가 또는 3가 금속이온을 포함한 수용액을 가하고, 실온에서 0.1~1 시간 동안 천천히 저어 준 다음, 동결 건조하여 고체 형태의 금속 양이온으로 고정시킨 고분자 미셀 또는 나노 파티클 조성물을 제조한다.

이하, 본 발명의 실시예를 다음에 의하여 설명한다.

그러나 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

제조예 1~11 폴리락트산 유도체의 합성

고분자는 2-히드록시 카르복시산 유도체를 촉매없이 가온(100~200 ℃) 및 감압(100~0.1 mmHg) 조건하에서 6~24 시간 반응 시킨 후 정제하여 제조하였다.

<제조예 1> D,L-폴리락트산(PLA-COOH) 합성 1

D,L-락트산 100 g을 250 ml의 삼구 둥근 바닥 플라스크에 넣고 교반기를 장치한 후 80℃로 가열한 기름 중탕에서 가열 및 감압 아스피레이터로 25 mmHg로 감압하면서 1 시간 동안 반응시켜 과량으로 존재하는 수분을 제거하였다.

반응 온도를 150℃로 상승시키고, 압력을 25 mmHg로 감압한 조건에서 6 시간 반응시킨 후 반응을 종결하고, 생성된 반응물에 1 l의 증류수를 가하여 고분자를 석출하였다.

석출된 고분자를 증류수에 다시 가하여 pH 4 이하의 수용액에서 용해되는 저분자량의 고분자를 제거한 후 석출된 고분자를 1 l의 증류수에 다시 가하였고, 탄산수소나트륨을 소량씩 가하여 수용액의 pH가 6~8이 되게 하여 고분자를 용해시켰다. 이때 물에 용해되지 않는 고분자는 원심분리 또는 필터 등의 방법으로 분리하여 제거하였다.

1N 염산 수용액을 소량씩 가하여 다시 수용액을 pH 2로 조절하여 고분자를 수용액에서 석출시켰다. 석출된 고분자를 증류수로 2번 더 행군 다음 분리하여 감압하에서 건조하여 점성이 매우 높은 액체(D,L-폴리락트산, 78 g, 수득률 78%)를 얻었다. 고분자의 수평균 분자량은 ¹H-NMR 스펙트럼으로 결정하였으며, 540 달톤이었다.

<제조예 2~4> D,L-폴리락트산(PLA-COOH) 합성 2

반응온도, 감압조건, 반응시간을 하기 표 1과 같이 조절한 것을 제외하고, 상기 제조예 1과 동일한 방법을 수행하여 D,L-폴리락트산을 얻었다.

상기 제조예 1~4에서 합성한 D,L-폴리락트산의 수평균 분자량 및 수득률은 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

제조예	반응온도 (℃)	반응시간 (시간)	압력 (mmHg)	수평균 분자량 (달톤)	수득률 (%)
1	150	6	25	540	78
2	160	12	10	1140	83
3	160	24	10	1550	84
4	160	24	5	2100	87

* 수득률=(얻어진 고분자/사용된 모노머)×100

<제조예 5> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체(PLGA-COOH) 합성 1

D,L-락트산 55 g(0.6 mole)과 글리콜산 45 g(0.6 mole)을 함께 250 ml의 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 반응 온도를 150℃로 상승시키고, 압력을 10 mmHg로 감압한 조건에서 12 시간 반응시킨 것을 제외하고, 상기 제조예 1과 동일한 방법을 수행하였다.

<제조예 6> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체(PLGA-COOH) 합성 2

D,L-락트산 73 g(0.8 mole)과 글리콜산 27 g(0.35 mole)을 함께 250 ml의 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 반응 온도를 160℃로 상승시키고, 압력을 10 mmHg로 감압한 조건에서 12 시간 반응시킨 것을 제외하고, 상기 제조예 1과 동

일한 방법을 수행하였다.

<제조예 7> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체(PLGA-COOH) 합성 3

D,L-락트산 91 g(1.0 mole)과 글리콜산 9 g(0.12 mole)을 함께 250 ml의 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 반응 온도를 160℃로 상승시키고, 압력을 10 mmHg로 감압한 조건에서 12 시간 반응시킨 것을 제외하고 상기 제조예 1과 동일한 방법을 수행하였다.

<제조예 8> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체(PLGA-COOH) 합성 4

D,L-락트산 73 g(0.8 mole)과 글리콜산 27 g(0.35 mole)을 함께 250 ml의 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 반응 온도를 180℃로 상승시키고, 압력을 5 mmHg로 감압한 조건에서 24 시간 반응시킨 것을 제외하고 상기 제조예 1과 동일한 방법을 수행하였다.

상기 제조예 5~8에서 합성한 D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체를 하기 표 2에 나타내었다.

[표 2]

제조예	락트산/글리콜산 몰비		반응온도 (℃)	반응시간 (시간)	압력 (mmHg)	수평균 분자량(달톤)	수득률 (%)
	반응물	생성물					
5	50/50	52/48	150	12	10	920	63
6	70/30	67/33	160	12	10	1040	65
7	90/10	91/9	160	12	10	1180	68
8	70/30	71/29	180	24	5	1650	73

<제조예 9> D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체(PLMA-COOH) 합성

D,L-락트산 75 g(0.83 mole)과 D,L-만델릭 산 25 g(0.16 mole)을 함께 250 ml의 3구 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 반응 온도를 180℃로 상승시키고, 압력을 10~20mmHg로 감압한 조건에서 5시간 반응시킨 것을 제외하고 상기 제조예 1과 동일한 방법을 수행하여 D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체(54 g, 수득률 54 %)를 얻었다. ¹H-NMR 측정을 통해서, 수평균분자량이 1,096 달톤인 고분자를 확인하였다.

<제조예 10> 아세톡시 D,L-폴리락트산 유도체의 (AcO-PLA-COOH) 합성

상기 제조예 2에서 합성한 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 1140 달톤) 50 g을 염화 아세트산 20 ml와 함께 250 ml 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 냉각기를 장치한 다음 질소기류 하에서 4 시간 동안 환류시켰다.

과량의 염화 아세트산을 증류하여 제거한 다음, 반응 생성물을 얼음과 물의 혼합 수용액에 혼합한 다음 천천히 저어서 고분자를 석출하였다.

석출된 고분자를 분리하여 증류수로 2번 세척한 다음, 무수 아세톤에 녹이고, 무수 황산 마그네슘을 가하여 과량의 수분을 제거하였다. 필터하여 황산 마그네슘을 제거하고, 진공 증발기로 아세톤을 제거하여 액체상의 아세톡시 D,L-폴리락트산(46 g, 수득률 92 %)을 얻었다. ¹H-NMR 측정 결과, 2.02 ppm의 단일 피크로 아세톡시기를 확인할 수 있었다.

<제조예 11> 팔미토일옥시 D,L-폴리락트산 유도체의 (PalmO-PLA-COOH) 합성

상기 실시예 2에서 합성한 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 1140 달톤) 20 g을 250 ml 둥근 바닥 플라스크에 넣고 120℃ 기름조(oil bath)에서 진공 조건으로 수분을 완전히 제거하였다. 기름조 온도를 50℃로 내리고 아세톤 50 ml를 첨가하여 고분자를 완전히 녹였다. 여기에 염화 팔미트산 5 ml를 첨가하여 반응온도를 50℃로 하고 질소분위기에서 10시간 반응시켰다. 반응 생성물 중에 존재하는 미반응물을 과량의 헥산으로 세척하여 제거한다. 헥산을 증류하여 제거한 다음, 다시 아세톤에 녹인 후 반응생성물을 얼음과 물의 혼합 수용액에 혼합한 다음 천천히 저어서 올리고머를

· 석출하였다.

석출된 올리고머를 분리하여 증류수로 2번 세척한 다음, 무수 아세톤에 녹이고, 무수 황산 마그네슘을 가하여 과량의 수분을 제거하였다. 필터하여 황산 마그네슘을 제거하고, 진공 증발기로 아세톤을 제거하여 팔미토일옥시 D,L-폴리락트산 유도체 (19.1 g, 수득률 96 %)을 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과, 0.88, 1.3, 2.38 ppm의 피크로 팔미토일기를 확인할 수 있었다.

제조예 12~22 폴리락트산 유도체의 카르복시산 염 합성

상기 제조예 1~11 에서 합성한 폴리락트산 유도체를 아세톤 용매에서 탄산수소나트륨, 탄산나트륨, 탄산수소칼륨 또는 탄산칼륨의 염기 수용액과 반응시켜 제조하였다.

<제조예 12> 폴리락트산 나트륨염(PLA-COONa)의 합성 1

상기 제조예 1에서 합성한 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 540 달톤)을 아세톤에 녹인 후 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 교반기를 장치한 후 상온에서 천천히 저어 준 후 탄산 수소 나트륨 수용액(1N)을 천천히 가하여 중화시켰다.

소량의 아세톤 용액을 취하여 다량의 증류수에 희석한 후 pH가 7 인 것을 확인 후, 무수 황산 마그네슘을 가하여 과량의 수분을 제거한 다음 필터하고, 용매 증발기로 아세톤을 증발시키고 흰색의 고체를 얻었다. 이를 다시 무수 아세톤에 녹인 후 필터하여 무수 아세톤에 녹지 않는 물질을 제거한 후 아세톤을 증발시켜 흰색의 고체 상태의 D,L-폴리락트산 나트륨염(수득률 96 %)을 얻었다.

하기 도 2 의 $^1\text{H-NMR}$ 을 통하여 말단 카르복시산기의 인접 수소의 피이크가 4.88 ppm 에서 관찰되는 것을 확인하였으며, 생성된 고분자를 물에 녹였을 때 수용액의 pH가 6.5~7.5 였다.

<제조예 13> 폴리락트산 나트륨 염(PLA-COONa)의 합성 2

상기 제조예 2에서 합성한 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 1140 달톤)을 사용 하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 폴리락트산 나트륨 염(수득률 95 %)을 합성하였다.

<제조예 14> 아세톡시 D,L-폴리락트산 나트륨 염(AcO-PLA-COONa)의 합성

상기 제조예 10에서 합성한 아세톡시 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 1140 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 아세톡시 D,L-폴리락트산 나트륨 염(수득률 95 %)을 합성하였다.

<제조예 15> 팔미토일옥시 D,L-폴리락트산 나트륨염(PalmitoylO-PLA-COONa)의 합성

상기 제조예 10에서 합성한 팔미토일옥시 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 1140달톤)을 아세톤 수용액 (28.6 v/v%)에 완전히 녹인 후 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 교반기를 장치한 후 상온에서 천천히 저어 준 후 탄산수소나트륨 수용액(1N)을 천천히 가하여 중화시켰다.

소량의 아세톤 용액을 취하여 다량의 증류수에 희석한 후 pH가 7인 것을 확인 후, 무수 황산 마그네슘을 가하여 과량의 수분을 제거한 다음 필터하고, 용매 증발기로 아세톤 수용액을 증발시키고 흰색의 고체를 얻었다. 이를 다시 무수 아세톤에 녹인 후 필터하여 무수 아세톤에 녹지 않는 물질을 제거한 후 아세톤을 증발시켜 흰색의 고체 상태의 팔미토일옥시 D,L-폴리락트산 나트륨염(수득률 96 %)을 얻었다.

<제조예 16> 폴리락트산 칼륨 염(PLA-COOK)의 합성

상기 제조예 3에서 합성한 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 1550 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 폴리락트산 칼륨 염(수득률 98 %)을 합성하였다.

<제조예 17> 폴리락트산 나트륨 염(PLA-COONa)의 합성 3

상기 제조예 4에서 합성한 D,L-폴리락트산(수평균 분자량 2100 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 폴리락트산 나트륨 염(수득률 95 %)을 합성하였다.

<제조예 18> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 나트륨 염(PLGA-COONa)의 합성 1

·상기 제조예 5에서 합성한 D,L-락트산과 글리콜산 공중합체(수평균 분자량 920 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 나트륨 염(수득률 98 %)을 합성하였다.

<제조예 19> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 나트륨 염(PLGA-COONa)의 합성 2

상기 제조예 6에서 합성한 D,L-락트산과 글리콜산 공중합체(수평균 분자량 1040 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 나트륨 염(수득률 93 %)을 합성하였다.

<제조예 20> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 칼륨 염(PLGA-COOK)의 합성

상기 제조예 7에서 합성한 D,L-락트산과 글리콜산 공중합체(수평균 분자량 1180 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 칼륨 염(수득률 92 %)을 합성하였다.

<제조예 21> D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 나트륨 염(PLGA-COONa)의 합성 3

상기 제조예 8에서 합성한 D,L-락트산과 글리콜산 공중합체(수평균 분자량 1650 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체의 나트륨 염(수득률 98 %)을 합성하였다.

<제조예 22> D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체의 나트륨 염(PLMA-COONa)의 합성

상기 제조예 9에서 합성한 D,L-락트산과 만델릭산 공중합체(수평균 분자량 1096 달톤)을 사용하는 것을 제외하고, 상기 제조예 12와 동일한 방법을 수행하여 D,L-락트산과 만델릭산의 공중합체의 나트륨 염(수득률 96 %)을 합성하였다.

상기 제조예 12~22에서 합성한 폴리락트산 유도체의 카르복시산 염을 하기 표 3 에 나타내었다.

[표 3]

제조예	반응물(분자량)	염기	생성물	수평균분자량(달톤)	수득률(%)
12	PLA-COOH(540)	NaHCO ₃	PLA-COONa	540	96
13	PLA-COOH(1140)	Na ₂ CO ₃	PLA-COONa	1140	95
14	AcO-PLA-COOH(1140)	Na ₂ CO ₃	AcO-PLA-COONa	1140	95
15	PalmitoylO-PLA-COOH(1140)	NaHCO ₃	PalmitoylO-PLA-COONa	1140	96
16	PLA-COOH(1550)	KHCO ₃	PLA-COOK	1550	98
17	PLA-COOH(2100)	NaHCO ₃	PLA-COONa	2100	95
18	PLGA-COOH(920)	Na ₂ CO ₃	PLGA-COONa	920	98
19	PLGA-COOH(1040)	NaHCO ₃	PLGA-COONa	1040	93
20	PLGA-COOH(1180)	K ₂ CO ₃	PLGA-COOK	1180	92
21	PLGA-COOH(1650)	NaHCO ₃	PLGA-COONa	1650	98
22	PLMA-COOH(1096)	NaHCO ₃	PLMA-COONa	1096	96

제조예 23~29 친수성 블록(A)과 소수성 블록(B)의 A-B형 블록 공중합체 합성

<제조예 23> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA) 블록 공중합체 중합(A-B형)

모노메톡시폴리에틸렌글리콜(중량평균 분자량 2,000 달톤) 5.0 g을 2 구 100 ml 둥근바닥 플라스크에 넣은 후 감압(1 mmHg)하에서 3~4 시간 동안 130℃로 가열하여 수분을 제거시켰다. 반응플라스크 내를 건조시킨 질소로 충전하고,

· 주사기를 이용하여 반응 촉매인 스테이너스 옥토에이트($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)를 락타이드의 0.1 중량%(10.13 mg, 25 mmol)을 가하고, 30분 동안 교반한 후 130℃에서 1 시간 동안 감압(1mmHg)하여 촉매를 용해시킨 용매(톨루엔)를 제거하였다. 정제한 락타이드 10.13 g을 가한 후, 130℃에서 18 시간 가열하였다. 생성된 고분자를 메틸렌 클로라이드에 용해시킨 후 디에틸에테르에 가하여 고분자를 침전시켰다. 얻어진 고분자를 진공오븐에서 48 시간 건조하였다.

상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA)의 중량평균 분자량은 2,000-1,766 달톤이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 A-B형임을 알 수 있었다.

<제조예 24> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA) 블록 공중합체 중합(A-B형)

모노메톡시폴리에틸렌글리콜(중량평균 분자량 2,000 달톤) 5.0 g을 2 구 100 ml 둥근바닥 플라스크에 넣은 후 감압(1 mmHg)하에서 3~4 시간 동안 130℃로 가열하여 수분을 제거시켰다. 반응플라스크 내를 건조시킨 질소로 충전하고, 주사기를 이용하여 반응 촉매인 스테이너스 옥토에이트($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)를 락타이드의 0.1중량%(13.75 mg, 34 mmol)을 가하고, 30분 동안 교반한 후 130℃에서 1 시간 동안 감압(1mmHg)하여 촉매를 용해시킨 용매(톨루엔)를 제거하였다. 정제한 락타이드 13.75 g을 가한 후, 130℃에서 18 시간 가열하였다. 생성된 고분자를 에탄올에 용해시킨 후 디에틸 에테르에 가하여 고분자를 침전시켰다. 얻어진 고분자를 진공오븐에서 48 시간 건조하였다.

상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA)의 중량평균 분자량은 2,000-5,000 달톤이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 A-B형임을 알 수 있었다.

<제조예 25> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA) 블록 공중합체 중합(A-B형)

모노메톡시폴리에틸렌글리콜(중량평균 분자량 2,000 달톤) 5.0 g을 2 구 100 ml 둥근바닥 플라스크에 넣은 후 감압(1 mmHg)하에서 3~4 시간 동안 130℃로 가열하여 수분을 제거시켰다. 반응플라스크 내를 건조시킨 질소로 충전하고, 주사기를 이용하여 반응 촉매인 스테이너스 옥토에이트($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)를 락타이드의 0.1중량%(22.0 mg, 55 mmol)을 가하고, 30분 동안 교반한 후 130℃에서 1 시간 동안 감압(1mmHg)하여 촉매를 용해시킨 용매(톨루엔)를 제거하였다. 정제한 락타이드 22.0 g을 가한 후, 130℃에서 18 시간 가열하였다. 생성된 고분자를 에탄올에 용해시킨 후 디에틸 에테르에 가하여 고분자를 침전시켰다. 얻어진 고분자를 진공오븐에서 48 시간 건조하였다.

상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA)의 중량평균 분자량은 2,000-8,000 달톤이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 A-B형임을 알 수 있었다.

<제조예 26> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리(락틱-co-글리콜라이드)(mPEG-PLGA) 블록 공중합체 중합(A-B형)

상기 제조예 23의 방법에 따라 모노메톡시폴리에틸렌글리콜(중량평균 분자량 5,000 달톤)과 락타이드 및 글리콜라이드를 스테이너스옥토에이트 촉매와 함께 120℃에서 12 시간 반응시켜 합성하였다.

상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리(락틱-co-글리콜라이드)(mPEG-PLGA)의 중량평균 분자량은 5,000-4,000 달톤이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 A-B형임을 알 수 있었다.

<제조예 27> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리(락틱-co-파라다이옥산-2-온) (mPEG-PLDO) 블록 공중합체 중합(A-B형)

상기 제조예 23의 방법에 따라 모노메톡시폴리에틸렌글리콜(중량평균 분자량 12,000달톤)과 락타이드 및 파라다이옥산-2-온을 스테이너스옥토에이트 촉매와 함께 110℃에서 12 시간 반응시켜 합성하였다.

상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리(락틱-co-파라다이옥산-2-온) (mPEG-PLDO)의 중량평균 분자량은 12,000-10,000 달톤 이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 A-B형임을 알 수 있었다.

<제조예 28> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리카프로락톤(mPEG-PCL) 블록 공중합체 중합(A-B형)

상기 제조예 23의 방법에 따라 모노메톡시폴리에틸렌글리콜(중량평균 분자량 12,000 달톤)과 카프로락톤을 스테이너스옥토에이트 촉매와 함께 130℃에서 12 시간 반응시켜 합성하였다.

상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리카프로락톤(mPEG-PCL)의 중량평균 분자량은 12,000-5,000 달톤 이었다. 또한, $^1\text{H-NMR}$ 을 이용하여 A-B형임을 알 수 있었다.

• <제조예 29> 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드-팔미테이트(mPEG-PLA- palmitate) 블록 공중합체 중합 (A-B형)

합성된 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드(mPEG-PLA) (Mn:2000- 1750, 20g)을 플라스크에 넣고 120℃ 오일배스(oil bath)에서 진공조건으로 수분을 완전히 제거시켰다. 온도를 50℃로 낮추고 아세톤 50ml 를 첨가하여 고분자를 완전히 용해시켰다. 여기에 팔미토일 클로리드 2 ml (Palmitoyl chloride/mPEG-PLA=1.2/1 몰비)를 첨가하고, 반응온도를 50℃로 하여 질소기류 하에서 10시간 반응시켰다. 반응물을 과량의 헥산으로 미 반응물을 세척하고, 얻어진 고분자를 methylene chloride에 용해시킨 후 다시 diethyl ether로 침전시키고 여과하였다. 얻어진 고분자를 진공오븐에서 48시간 건조하였다. 상기 모노메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락타이드 팔미테이트 (mPEG-PLA-palmitate)의 중량평균 분자량은 2,000-1,800 달톤이었다. 또한 ¹H-NMR을 이용하여 mPEG-PLA 말단기인 -OH에 palmitoyl기가 결합되었음을 알 수 있었다.

상기 제조예 23~27 에서 합성한 블록 공중합체를 하기 표 4 에 나타내었다

[표 4]

제조예	양친성 블록 공중합체	중량평균 분자량 (달톤)	수득률(%)
23	mPEG-PLA	2,000-1,765	86
24	mPEG-PLA	2,000-5,000	87
25	mPEG-PLA	2,000-8,000	85
26	mPEG-PLGA	5,000-4,000	90
27	mPEG-PLDO	12,000-10,000	78
28	mPEG-PCL	12,000-5,000	93
29	mPEG-PLA-palmitate	2,000-1,800	90

실시예 1~3 2가 또는 3가 금속이온염으로 고정시킨 난용성 약물 함유 고분자 미셀 또는 나노 파티클의 제조

<실시예 1> Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

단계 1 : 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

상기 제조예 13의 D,L-PLA-COONa(분자량 : 1140) 130 mg(114 mmol), 파클리탁셀 30 mg 및 상기 제조예 23의 양친성 블록 공중합체 mPEG-PLA(분자량 2,000-1,765 달톤) 100 mg을 아세톤 2 ml에 완전히 용해시켜 맑은 용액을 제조하였다. 상기 아세톤을 제거한 후 파클리탁셀 함유 고분자 조성물을 제조하였다. 상기 파클리탁셀 함유 고분자 조성물에 증류수 2.5 ml를 가하고, 40℃에서 30분간 저어서 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 수용액을 제조하였다.

단계 2 : 2가 금속이온염으로 고정하는 단계

0.2 M 무수 염화칼슘 수용액 0.29 ml(58 mmol)를 상기 단계 1에서 제조한 고분자 미셀 수용액에 가한 후 실온에서 20분간 저어주었다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과한 후 동결 건조하였다.

상기 실시예에서 파클리탁셀 함량 및 용해도는 HPLC로 정량하였으며, 입자크기는 다이나믹 라이터 스캐터링(DLS) 법으로 측정하였다.

D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 조성비(중량비) : 56.5/43.5

파클리탁셀 함량 : 11.5 중량 %

수용액에 대한 파클리탁셀 용해도 : 10.7 mg/ml

입자크기 : 18 nm

<실시예 2> Mg²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

0.2 M 무수 염화마그네슘 수용액 0.29 ml (58 mmol)를 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조한 고분자 미셀 수용액에 가한 후 실온에서 20분간 저어 주었다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과한 후 동결 건조하였다.

D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 조성비(중량비) : 56.5/43.5

파클리탁셀 함량 : 11.5 중량 %

수용액에 대한 파클리탁셀 용해도 : 10.7 mg/ml

입자크기 : 18 nm

<실시예 3> Zn²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

0.2 M 무수 염화아연 수용액 0.29 ml(58 mmol)를 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조한 고분자 미셀 수용액에 가한 후 실온에서 20분간 저어주었다. 구멍크기 가 200 nm인 필터를 이용하여 여과한 후 동결 건조하였다.

D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 조성비(중량비) : 56.5/43.5

파클리탁셀 함량 : 11.5 중량 %

수용액에 대한 파클리탁셀 용해도 : 10.7 mg/ml

입자크기 : 18 nm

<실시예 4> Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 D,L-PLMA-COONa, mPEG-PLA-Palmitate 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

상기 제조예 22의 D,L-PLMA-COONa(분자량 : 1096) 130 mg(114 mmol), 파클리탁셀 30 mg 및 상기 제조예 27의 양친성 블록 공중합체 mPEG-PLA-Palmitate(분자량 2000-1800 달톤) 100 mg를 이용하고 상기 아세톤 대신 에탄올을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 조성물을 제조하였다.

D,L-PLMA-COONa/mPEG-PLA-Palmitate 조성비(중량비) : 56.5/43.5

파클리탁셀 함량 : 11.5 중량 %

수용액에 대한 파클리탁셀 용해도 : 10.7 mg/ml

입자크기 : 18 nm

<실시예 5> Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

상기 제조예 13의 D,L-PLA-COONa(분자량 : 1140) 100 mg(88 mmol), 파클리탁셀 10 mg 및 상기 제조예 24의 양친성 블록 공중합체 mPEG-PLA (분자량 2000-5000 달톤) 90 mg를 이용하고 상기 아세톤 대신 에탄올을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 조성물을 제조하였다.

D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 조성비(중량비) : 54/46

파클리탁셀 함량 : 5.0 중량 %

수용액에 대한 파클리탁셀 용해도 : 10.0 mg/ml

입자크기 : 58 nm

<실시예 6> Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 고분자 미셀 제조

상기 제조예 13의 D,L-PLA-COONa(분자량 : 1140) 150 mg(132 mmol), 파클리탁셀 10 mg 및 상기 제조예 25의 양친성 블록 공중합체 mPEG-PLA (분자량 2000-8000 달톤) 90 mg를 이용하고 상기 아세톤 대신 에탄올을 사용하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 조성물을 제조하였다.

D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA 조성비(중량비) : 63/37

파클리탁셀 함량 : 4.0 중량 %

수용액에 대한 파클리탁셀 용해도 : 10.0 mg/ml

입자크기 : 50 nm

<실험예 1> 금속이온염의 당량에 따른 고분자 미셀 또는 나노 파티클 조성물의 안정성 실험

금속이온염의 당량에 따른 고분자 미셀 또는 나노 파티클 조성물의 안정성을 실험하기 위해 하기와 같이 고분자 미셀 조성물을 제조하였다.

단계 1 : 파클리탁셀 함유 D,L-PLA-COONa, mPEG-PLA 블록 공중합체 혼합 고분자 미셀 제조

상기 실시예 1의 D,L-PLA-COONa(분자량 1140) 170 mg(149 mmol), 파클리탁셀 30 mg 및 양친성 블록 공중합체 mPEG-PLA(분자량 2,000-1,765 달톤) 50 mg를 아세톤 2 ml에 용해시켜서 맑은 용액을 제조하였다. 아세톤을 제거한 후 파클리탁셀 함유 혼합 고분자 미셀 조성물을 제조하였다. 상기 혼합 고분자 미셀 조성물에 증류수 3 ml를 가하고, 40 °C에서 30분 간 저어서 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 수용액을 제조하였다.

단계 2 : 2가 금속이온염으로 고정하는 단계

상기 단계 1에서 제조한 파클리탁셀 함유 혼합 고분자 미셀 수용액을 각각 1 ml씩 3 등분 한 후 0.2 M 무수 염화칼슘 수용액을 각각 0.0625, 0.125, 0.25 ml(12.5, 25, 50 mmol)를 가하고, 실온에서 20분간 저어 주었다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과한 후 pH 7.4인 PBS(phosphate buffer solution)을 첨가 하여 파클리탁셀의 농도가 1 mg/ml이 되게 희석시킨 후 37 °C에서 배양하면서 파클리탁셀의 농도 변화를 HPLC로 측정하였다. 그 결과는 표 5에 나타내었다.

[표 5]

구분	mPEG-PLA/ D,L-PLA-COONa (중량비)	CaCl ₂ / D,L-PLA-COONa (당량)	약물 농도 (mg/ml)			
			0 시간	6 시간	12시간	24시간
0.25 당량	50/170	0.25/1.00	1.0	1.0	0.9	0.7
0.50 당량	50/170	0.50/1.00	1.0	1.0	1.0	1.0
1.0 당량	50/170	1.00/1.00	1.0	1.0	1.0	1.0
0 당량	50/170	0.00/1.00	1.0	0.4	0.2	0.2

상기 표 5에서 보는 바와 같이, 칼슘 이온을 첨가하지 않은 경우, 초기 약물 농도에 비해 24 시간 후 약물의 농도가 80 % 감소하여 24 시간 후 약물의 농도가 0.2 mg/ml이었다. 칼슘 양이온을 0.25 당량 첨가한 경우 24 시간 후 0.7 mg/ml으로 초기 농도에 비해 30 % 정도 감소하였으며, 칼슘 이온을 첨가하지 않은 경우 보다 3 배 이상 약물 농도가 향상됨을 알 수 있다. 또한, 0.5 당량 이상 첨가하였을 경우, 24 시간 후 약물의 농도가 변함이 없음을 알 수 있었다.

- 상술한 바와 같이, 칼슘 양이온 처리하지 않은 조성물에 비해서 칼슘 처리한 조성물이 보다 안정함을 알 수 있으며, 칼슘의 당량이 폴리락트산 유도체의 당량에 비하여 0.5 당량 이상 첨가한 경우, 안정성이 현저히 향상됨을 알 수 있다

<실험예 2> D,L-폴리락트산 나트륨 염(D,L-PLA-COONa)의 분자량에 따른 고분자 나노파티클의 안정성 실험

D,L-폴리락트산 나트륨 염(D,L-PLA-COONa)의 분자량에 따른 나노파티클 조성 물의 안정성을 실험하기 위해 하기와 같이 고분자 조성물을 제조하였다.

파클리탁셀, mPEG-PLA(분자량 2,000-1,776) 및 분자량이 646, 1145, 1500 또는 2300인 D,L-PLA-COONa을 당량비 1:3:3로 혼합한 후 무수에탄올 5 ml에 용해 시켜서 맑은 용액을 제조하였다. 증류수 12 ml을 가한 후 60 ℃에서 10분간 저어서 파클리탁셀 함유 혼합 고분자 미셀 수용액을 제조하였다. 상기 혼합 고분자 미셀 수용액에 D,L-PLA-COONa과 같은 당량의 염화 칼슘 수용액(농도 100 mg/ml)을 가하고, 실온에서 20분간 저어 주었다. 구멍 크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과한 후 pH 7.4인 PBS 완충용액을 첨가하여 파클리탁셀의 농도가 1 mg/ml이 되게 희석시키고, 37 ℃에서 방치하면서 시간에 따른 파클리탁셀의 농도를 HPLC를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 표 6 에 나타내었다.

[표 6]

D,L-PLA-COONa의 분자량	약물농도 (mg/ml)								
	0 일	1 일	2 일	3 일	5 일	7 일	10 일	12 일	14 일
646	1.00	0.39	0.23	0.20	0.17	0.17	0.16	0.16	0.15
1145	1.00	0.74	0.58	0.47	0.33	0.32	0.28	0.25	0.23
1500	1.00	0.98	0.91	0.80	0.54	0.51	0.46	0.36	0.36
2300	1.00	1.00	0.99	0.98	0.80	0.75	0.68	0.64	0.62

상기 표 6 에서 보는 바와 같이, D,L-PLA-COONa의 분자량이 646, 1145, 1500 및 2300으로 증가할수록 14일 후의 약물의 농도는 각각 0.15, 0.23, 0.36 및 0.62 mg/ml로 증가하였다. 상기 결과로부터, D,L-PLA-COONa의 분자량이 증가할수록 약물이 잘 석출되지 않는 것으로 보아 고분자 나노파티클 조성물이 상대적으로 안정해짐을 알 수 있었다.

<실험예 3> D,L-폴리락트산 나트륨염(D,L-PLA-COONa)의 당량에 따른 고분자 나노파티클의 안정성 실험

D,L-폴리락트산 나트륨 염(D,L-PLA-COONa)의 당량에 따른 고분자 나노파티클 조성물의 안정성을 실험하기 위해 하기와 같이 고분자 조성물을 제조하였다.

파클리탁셀, mPEG-PLA(분자량 2,000-1,776), D,L-PLA-COONa(분자량 1145)를 당량비가 1:2:x(x는 2, 4, 6, 8, 10 또는 12)인 혼합물에 무수에탄올 5 ml 용해시켜 맑은 용액을 제조하였다. 증류수 12 ml을 가한 후 60 ℃에서 10분간 저어서 파클리탁셀 함유 혼합 고분자 미셀 수용액을 제조하였다. 상기 혼합 고분자 미셀 수용액에 100 mg/ml의 염화칼슘 수용액을 D,L-PLA-COONa과 동일한 당량으로 가한 후 실온에서 20분간 저어 주었다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과하였고, pH 7.4인 PBS 완충용액을 첨가하여 파클리탁셀의 농도가 1 mg/ml 이 되게 희석시킨 후, 37 ℃에서 방치하면서 시간에 따른 파클리탁셀의 농도를 측정하였다. 상기 실험예에 대한 결과는 표 7 에 나타내었다.

[표 7]

D,L-PLA-COONa/mPEG-PLA (당량비, x/2)	약물농도 (mg/ml)								
	0 일	1 일	2 일	3 일	5 일	7 일	10 일	12 일	14 일
2/2	1.00	0.25	0.20	0.14	0.12	0.10	0.08	0.08	0.07
4/2	1.00	0.41	0.27	0.22	0.17	0.14	0.12	0.11	0.08

6/2	1.00	1.00	0.96	0.90	0.78	0.71	0.64	0.64	0.59
8/2	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	0.95	0.90	0.85	0.80
10/2	1.00	1.00	1.00	0.97	0.95	0.93	0.87	0.78	0.67
12/2	1.00	0.98	0.96	0.95	0.95	0.91	0.89	0.78	0.61

상기 표 7 에서 보는 바와 같이, D,L-PLA-COONa당량이 증가함에 따라 고분자 나노파티클의 안정성이 증가하였으며, 당량비가 6/2 이상에서는 안정성이 현저히 향상되었다. 특히, 당량비가 8/2 인 경우, 14 일 후 약물 농도가 0.80 mg/ml로 최대의 약물 농도를 나타내고 있다.

<실험예 4> Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 나노파티클의 혈중 체류성

Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 나노파티클의 혈중 체류성을 실험하기 위해 하기와 같이 고분자 조성물을 제조하였다.

(조성 1) 파클리탁셀, 블록공중합체, 폴리락트산 및 금속이온염으로 이루어진 난용성 약물을 함유한 고분자 나노파티클

파클리탁셀, mPEG-PLA(분자량 2,000-1,776), D,L-PLA-COONa(분자량 1145)를 당량비 1:5:20으로 혼합한 후 무수에탄올 5 ml에 용해시켜서 맑은 용액을 제조하였다. 증류수 4 ml을 가하고, 60 ℃에서 10분간 저어서 파클리탁셀 함유 혼합 고분자 미셀 수용액을 제조하였다. 상기 고분자 미셀 수용액에 100 mg/ml의 무수 염화칼슘 수용액을 D,L-PLA-COONa과 동일한 당량으로 가하고, 실온에서 20 분간 저어 주었다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과하였다(도 3 의 조성 1).

(조성 2) 파클리탁셀, 블록공중합체 및 폴리락트산으로 이루어진 난용성 약물이 함유된 혼합 고분자 미셀

파클리탁셀, mPEG-PLA(분자량 2,000-1,776) 및 D,L-PLA-COONa(분자량 1145)을 당량비 1:5:20으로 혼합한 후 무수에탄올 5 ml에 용해시켜 맑은 용액을 제조하였다. 증류수 4 ml을 가하고, 60 ℃에서 10분간 저어서 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 수용액을 제조하였다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과 하였다.

(조성 3) 파클리탁셀 및 블록공중합체으로 이루어진 난용성 약물이 함유된 고분자 미셀

파클리탁셀, mPEG-PLA(분자량 2,000-1,776)를 당량비 1:5으로 혼합한 후 무수에탄올 5 ml에 용해시켜 맑은 용액을 제조하였다. 증류수 5 ml을 가하고, 60 ℃에서 10분간 저어서 파클리탁셀 함유 고분자 미셀 수용액을 제조하였다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과하였다.

상기 조성 및 약물 함량을 하기 표 8 에 요약하였다.

[표 8]

구 분	mPEG-PLA (mg)	D,L-PLA-COONa (mg)	파클리탁셀 (mg)	CaCl ₂ (mg)	파클리탁셀 함량 (mg/ml)
조성 1	436.9	536.4	20.0	52.0	3.5
조성 2	436.9	536.4	20.0	-	3.6
조성 3	436.9	-	20.0	-	3.7

동물 실험을 위하여, 230~250 g의 수컷 쥐(male Sprague-Dawley rats)의 대퇴동맥과 대퇴정맥에 가는 관을 삽입 하고 조성 1, 조성 2 및 조성 3을 파클리탁셀 10 mg/kg의 용량으로 대퇴정맥 내로 15 초간 주입하였다. 주입 후 대퇴 동맥으로 1, 15, 30, 45분, 및 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8시간에 전혈 0.3 ml을 취하여 원심분리한 후 상층의 맑은 혈장을 얻었다.

또한, 혈장 중 약물 농도 분석을 위하여, 혈장 0.1 ml를 뚜껑달린 유리관에 넣고 내부 표준 물질이 든 아세토니트릴 용액 0.1 ml을 가하였다. 상기 용액에 10 ml의 에틸아세테이트를 가하고 30초간 격렬히 교반한 후 2500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 에틸아세테이트 층을 모두 취해 시험관에 옮기고 질소기하에 40 ℃ 유기용매를 완전히 증발시켰다. 40% (v/v) 아세토니트릴 수용액 0.1 ml을 가하고 30초간 격렬히 교반한 후 고속액체크로마토그래프(HPLC)에 주입하였다. HPLC 조건은 다음과 같다. 주입용량 0.075 ml, 유속 1.0 ml/min, 파장 227 nm, 이동상은 5분간 24 % 아세토니트릴 수용액으로 흘려 주고 16분간 아세토니트릴 농도를 58 %까지 높이고 다시 2분간 아세토니트릴 농도를 70 %까지 증가시켰다. 다시 4 분간 34 % 까지 낮추고 5분간 유지하였다. 칼럼은 4.6 ×50 mm(C18, 바이닥, 미국)를 사용하였다. 혈장 중 약물 농도 분석 결과를 하기 표 9 및 도 3 에 나타내었다.

[표 9]

	파클리탁셀 혈장 중 농도($\mu\text{g/ml}$)											
	1분	15분	30분	45분	1시간	1.5시간	2시간	3시간	4시간	5시간	6시간	8시간
조성 1	82.6	17.8	10.1	6.5	5.4	2.8	2.1	1.2	0.70	0.46	0.32	0.18
조성 2	31.8	4.1	3.0	2.2	1.7	1.2	0.71	0.33	0.23	0.13	0.08	0.04
조성 3	30.4	2.4	1.6	1.1	0.90	0.66	0.39	0.17	0.09	0.07	0.03	0.02

표 9 및 도 3 에서 보는 바와 같이, mPEG-PLA 블록 공중합체 만을 사용한 조성 3에 비해 D,L-PLA-COONa를 가한 조성 2가 더 오래 혈중에 체류하였으며, 본 발명의 Ca^{2+} 이온으로 처리한 조성 1이 조성 2 보다 더욱 오래 혈중에 체류하여 본 발명의 고분자 미셀 조성물에 의해 형성된 난용성 약물 함유 혼합 고분자 미셀이 혈액내 약물의 농도를 오래 유지할 수 있으며, 특히 금속이온으로 고정된 고분자 나노파티클 조성물이 혈액내 약물의 농도를 더욱 오래 유지할 수 있다.

<실험예 5> Ca^{2+} 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 나노파티클의 혈중 체류성

Ca^{2+} 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 나노파티클과 다른 담체로 이루어진 제제간의 혈중 체류성을 비교 실험하기 위해 하기와 같이 제제의 조성물을 제조하였다.

(조성 4) 파클리탁셀, 블록공중합체, 폴리락트산 및 금속이온염으로 이루어진 난용성 약물을 함유한 고분자 나노파티클

파클리탁셀, mPEG-PLA(분자량 2,000-1,776), D,L-PLMA-COONa(분자량 1198)를 중량비 49.5:49.5:1으로 혼합한 후 무수에탄올 5 ml에 용해시켜서 맑은 용액을 제조하였다. 증류수 4 ml을 가하고, 60 ℃에서 10분간 저어서 파클리탁셀 함유 혼합 고분자 미셀 수용액을 제조하였다. 상기 혼합 고분자 미셀 수용액에 100 mg/ml의 무수 염화칼슘 수용액을 D,L-PLMA-COONa과 동일한 당량으로 가하고, 실온에서 20 분간 저어 주었다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과하였다

(조성 5) 파클리탁셀, 크레모포아 EL 및 무수에탄올로 이루어진 조성물

크레모포아 EL 및 무수에탄올을 부피비 50:50로 혼합한 용액 5 ml에 파클리탁셀 30 mg을 용해시켜 맑은 용액을 제조하였다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과 하였다.

(조성 6) 파클리탁셀, 폴리솔르베이트 80 (트윈 80) 및 무수에탄올에 이루어진 조성물

폴리솔르베이트 80 및 무수에탄올을 부피비 50:50로 혼합한 용액 5 ml에 파클리탁셀 30 mg을 용해시켜 맑은 용액을 제조하였다. 구멍크기가 200 nm인 필터를 이용하여 여과 하였다.

상기 조성 및 약물 함량을 하기 표 10 에 요약하였다.

[표 10]

조성 4	mPEG-PLA (mg)	D,L-PLMA-COONa (mg)	파클리탁셀 (mg)	CaCl ₂ (mg)	파클리탁셀 함량 (mg/ml)
	990	990	20.0	100.6	1.6
조성 5	크레모포아 EL (ml)	무수 에탄올 (ml)	파클리탁셀 (mg)	-	파클리탁셀 함량 (mg/ml)
	2.5	2.5	30.0	-	1.5
조성 6	트윈 80 (ml)	무수 에탄올 (ml)	파클리탁셀 (mg)	-	파클리탁셀 함량
	2.5	2.5	30.0	-	1.5

동물 실험을 위하여, 230~250 g의 수컷 쥐(male Sprague-Dawley rats)의 대퇴동맥과 대퇴정맥에 가는 관을 삽입하고 조성 4, 조성 5 및 조성 6을 파클리탁셀 5 mg/kg의 용량으로 대퇴정맥 내로 15 초간 주입하였다. 주입 후 대퇴동맥으로 1, 15, 30분 및 1, 1.5, 2, 3, 4, 6시간에 전혈 0.3 ml를 취하여 원심분리한 후 상층의 맑은 혈장을 얻었다.

또한, 혈장 중 약물 농도 분석은 실험에 4와 같은 방법으로 분석하였으며 혈장 중 약물 농도 분석 결과를 하기 표 11 및 도 4 에 나타내었다.

[표 11]

	파클리탁셀 혈장 중 농도($\mu\text{g/ml}$)								
	1분	15분	30분	1시간	1.5시간	2시간	3시간	4시간	6시간
조성 4	86.5	9.68	4.71	1.97	1.10	0.78	0.35	0.26	0.14
조성 5	45.7	6.60	3.20	1.40	0.75	0.46	0.25	0.16	0.09
조성 6	13.9	0.64	0.26	0.10	0.07	0.04	-	-	-

표 11 및 도 4 에서 보는 바와 같이, 다른 계면활성제를 이용한 주사제형 (조성 5 및 조성 6)에 비해 Ca²⁺ 이온으로 고정된 고분자 나노파티클(조성 4)이 더 오래 혈중에 체류하였다. 본 발명의 Ca²⁺ 이온으로 처리한 고분자 나노파티클(조성 4)이 시판제제인 탁솔[®] (조성 5)보다 더욱 오래 혈중에 체류하는 것으로부터 본 발명은 생분해성 및 생체 적합성 고분자를 이용하여 혈중 체류성을 탁솔[®] 제제이상으로 유지시킬 수 있음을 알 수 있다.

<실험예 6> Ca²⁺ 이온으로 고정된 파클리탁셀 함유 고분자 나노파티클의 항종양 활성

흉선이 없는 건강한 암컷 누드 마우스 (nude (nu/nu) athymic mice) (20 g, 8주령, n=6)의 옆구리 피하에 7×10^6 개의 인간 암세포(human cancer cells)(PPC1, HT29)를 함유하는 세포현탁액 0.1 ml를 투여하였다. 일정크기의 고형암 덩어리가 되면 다시 3번 이종이식(Xenograft)하여 3-4 mm되는 이종이식편(xenograft fragments)을 만들었다.

흉선이 없는 건강한 암컷 누드 마우스(20 g, 8주령, n=5)의 옆구리 피하에 이종이식편(3-4 mm)을 12 게이지 트로카 주사기(12 gauge trocar needles)로 투여하고 종양용적이 100-300 mm³ 에 도달하였을 때 약물을 투여하였으며 이 시점을 0일로 하였다. 0일째 무작위로 1군당 5마리씩 군을 나누고, 0, 1 및 2일째에 금속이온으로 처리된 고분자 나노파티클 (조성4) 및 크레모포아 EL 제제 (조성 5)를 파클리탁셀을 20 mg/kg 용량으로 꼬리정맥을 통해 투여한 후 경시적으로 종양용적을 측정하였다. 종양용적은 식 $(W^2 \times L)/2$ (여기서 W는 단축, L은 장축)을 이용하여 계산하였다.

도 5a 및 도 5b 에 나타낸 바와 같이 파클리탁셀 20 mg/kg 용량의 금속이온으로 처리된 고분자 나노파티클(조성4)과 크레모포아 EL 제제 모두 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 상당히 큰 종양억제율을 보였으며, 특히 금속이온으로 처리된 고분자 나노파티클의 항암활성은 크레모포아 EL 제제에 비해 종양억제정도가 더 크게 나타났다.

발명의 효과

- 상술한 바와 같이, 본 발명은 양친성 블록 공중합체, 폴릴락트산 유도체 및 금속이온으로 이루어진 수용액에서 안정한 미셀 또는 나노 파티클을 형성하는 고분자 조성물을 제조하였으며, 상기 고분자 조성물에 의해 형성되는 고분자 미셀 또는 나노파티클은 다량의 약물을 함유할 수 있으며, 특히, 금속이온과 폴릴락트산 카르복시 말단기의 1가 금속 양이온과 치환반응하여 금속이온 결합을 형성하며, 상기 형성된 금속이온 결합으로 인해 고분자 미셀의 안정성을 더욱 향상시켰으며, 또한, 금속이온의 첨가하는 당량을 조절하여 약물의 방출 속도를 조절할 수 있어 약물의 혈중 농도를 오래 지속할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

친수성 블록과 소수성 블록으로 구성된 양친성 블록 공중합체 및

카르복시산 말단기를 함유하는 폴릴락트산 유도체를 포함하고,

상기 폴릴락트산 유도체의 카르복시 말단이 2가 또는 3가 금속이온으로 고정된 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 양친성 블록 공중합체가 폴릴알킬렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴릴비닐피롤리돈, 폴릴비닐알콜 및 폴리아크릴아마이드로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 친수성 블록 및

폴릴락타이드, 폴릴글리콜라이드, 폴릴다이옥산-2-온, 폴리카프로락톤, 폴릴락틴-*co*-글리콜라이드, 폴릴락틱-*co*-카프로락톤 및 폴릴락틱-*co*-다이옥산-2-온으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 소수성 블록으로 구성된 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 친수성 블록과 소수성 블록의 수평균 분자량이 각각 500~50,000 달톤인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 양친성 블록 공중합체내의 친수성 블록과 소수성 블록의 비가 2:8~8:2(w/w)인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

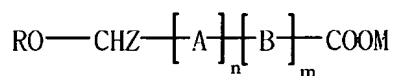
청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 양친성 블록공중합체는 5~95중량%이고, 폴릴락트산 유도체는 5~95중량%인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

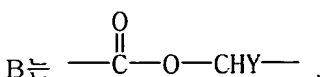
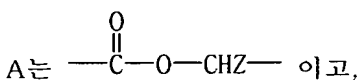
청구항 6.

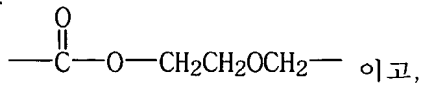
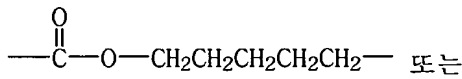
제 1항에 있어서, 상기 폴릴락트산 유도체가 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

화학식 1



(상기 식에서,





R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸 또는 에틸기이며,

Z 및 Y는 수소, 메틸기 또는 페닐기이며,

M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이며,

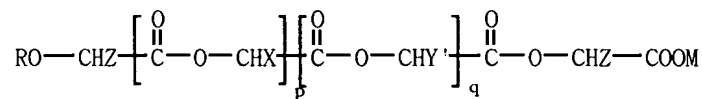
n은 1~30의 정수이며,

m은 0~20의 정수이다.)

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 폴리락트산 유도체가 하기 화학식 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

화학식 2



(상기 식에서,

X는 메틸기이며,

Y'는 수소 또는 페닐기이며,

p는 0~25의 정수이며,

q는 0~25의 정수이며,

단, p+q는 5~25의 정수이며,

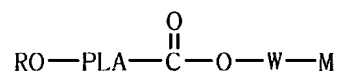
R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 데카노일기, 팔미토일기, 메틸 또는 에틸기이며, Z는 수소, 메틸기 또는 페닐기이며,

M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이다.)

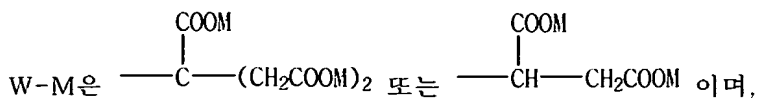
청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 폴리락트산 유도체가 하기 화학식 3로 표시되는 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

화학식 3



(상기 식에서,



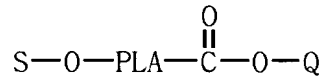
PLA는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것이고,

R은 수소, 아세틸기, 벤조일기, 테카노일기, 팔미토일기, 메틸 또는 에틸기이며, M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이다.)

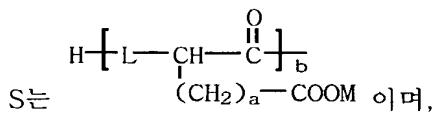
청구항 9.

제 1항에 있어서, 상기 폴리락트산 유도체가 하기 화학식 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

화학식 4



(상기식에서,



L은 $-\text{NR}_1-$ 또는 $-\text{O}-$ 이며,

R_1 은 수소 또는 $\text{C}_1 \sim \text{C}_{10}$ 의 알킬이며,

Q는 CH_3 , CH_2CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 또는 $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 이며,

M은 수소, 나트륨, 칼륨 또는 리튬이며,

a는 0~4의 정수이며,

b는 1~10의 정수이며,

PLA는 D,L-폴리락트산, D-폴리락트산, 폴리만델산, D,L-락트산과 글리콜산의 공중합체, D,L-락트산과 만델산의 공중합체, D,L-락트산과 카프로락톤의 공중합체 및 D,L-락트산과 1,4-디옥산-2-온의 공중합체로 이루어지는 그룹에서 선택되는 것이다.)

청구항 10.

제 1항에 있어서, 상기 폴리락트산 유도체가 수평균 분자량 500~2,500 달톤인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 11.

제 1항에 있어서, 상기 폴리락트산 유도체가 촉매 없이 축합반응에 의해서 합성된 것을 탄산나트륨, 탄산수소나트륨 및 탄산칼륨으로 이루어진 그룹 중 선택되는 하나로 중화시켜 제조한 나트륨염 또는 칼륨염 형태인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 12.

제 1항에 있어서, 상기 폴리락트산 유도체가 PH 4이하의 수용액에서는 녹지 않으며, pH4이상의 수용액에서 녹아서 미셀을 형성하고 수평균 분자량이 500~2,500 달톤인 것을 특징으로 하는 고분자 조성물.

청구항 13.

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 고분자 조성물 및 2가 또는 3가의 금속이온이 폴리락트산 유도체의 카복시기의 1당량에 대하여 0.01~0.5당량인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물

청구항 14.

제 13항에 있어서, 상기 2가 또는 3가 금속이온이 칼슘(Ca^{2+}), 마그네슘(Mg^{2+}), 바륨(Ba^{2+}), 크롬(Cr^{3+}), 철(Fe^{3+}), 망간(Mn^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 아연(Zn^{2+}) 또는 알루미늄(Al^{3+})로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 미셀을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 15.

제 14항에 따른 고분자 조성물 70~99.9중량%

및 미셀의 소수성 코어 내에 봉입된 난용성 약물 0.1~30중량%을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 상기 난용성 약물이 물에 대한 용해도가 100 mg/ml이하이며, 파클리탁셀, 캄토테신, 에토포싸이드, 독소루비신, 다우소루비신, 이다루비신, 아라-C 등의 항암제, 싸이클로스포린 A 등의 면역억제제, 테스토스테론, 에스트라다이올, 에스트로젠, 프로게스테론, 트리암시론 아세테이트, 텍사메타손 등의 스테로이드 호르몬 약물, 테녹시캄, 피록시캄, 인도메타신, 이부프로펜 및 COX-II 인히비터로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 17.

제 1항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 따른 고분자 조성물 및 상기 2가 또는 3가 금속이온이 폴리락트산 유도체의 카르복시기의 1 당량에 대하여 0.5~10 당량인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 나노파티클을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 18.

제 17항에 있어서, 상기 2가 또는 3가 금속이온이 칼슘(Ca^{2+}), 마그네슘(Mg^{2+}), 바륨(Ba^{2+}), 크롬(Cr^{3+}), 철(Fe^{3+}), 망간(Mn^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 아연(Zn^{2+}) 또는 알루미늄(Al^{3+})로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는 수용액에서 안정한 나노파티클을 형성하는 고분자 조성물.

청구항 19.

제 18 항에 따른 고분자 조성물 70~99.9중량% 및 난용성 약물 0.1~30중량%을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 20.

난용성 약물을 포함하는 약학적 조성물 제조방법에 있어서,

양친성 블록 공중합체, 폴리락트산 유도체 및 난용성 약물을 유기 용매에 혼합하여 난용성 약물 함유 고분자 미셀 또는 나노파티클을 제조하는 단계(단계 1), 및

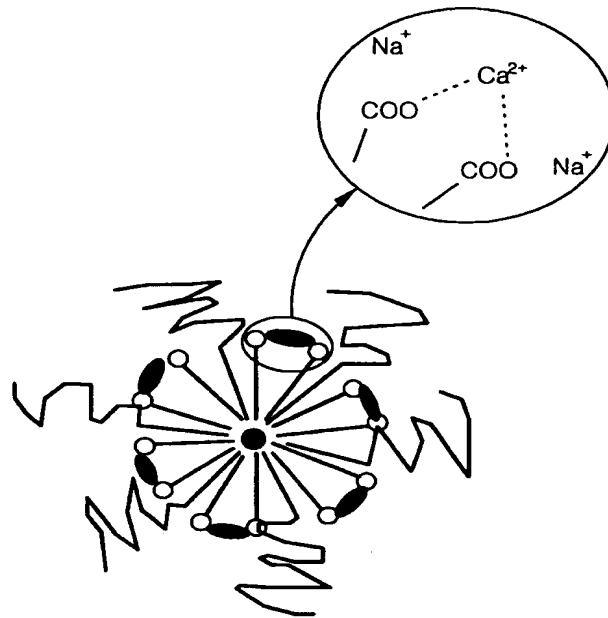
상기 제조한 고분자 미셀에 2가 또는 3가 금속이온염을 첨가하여 폴리락트산 유도체의 카르복시 말단기를 고정시키는 단계(단계 2)로 이루어진 제조방법.

청구항 21.

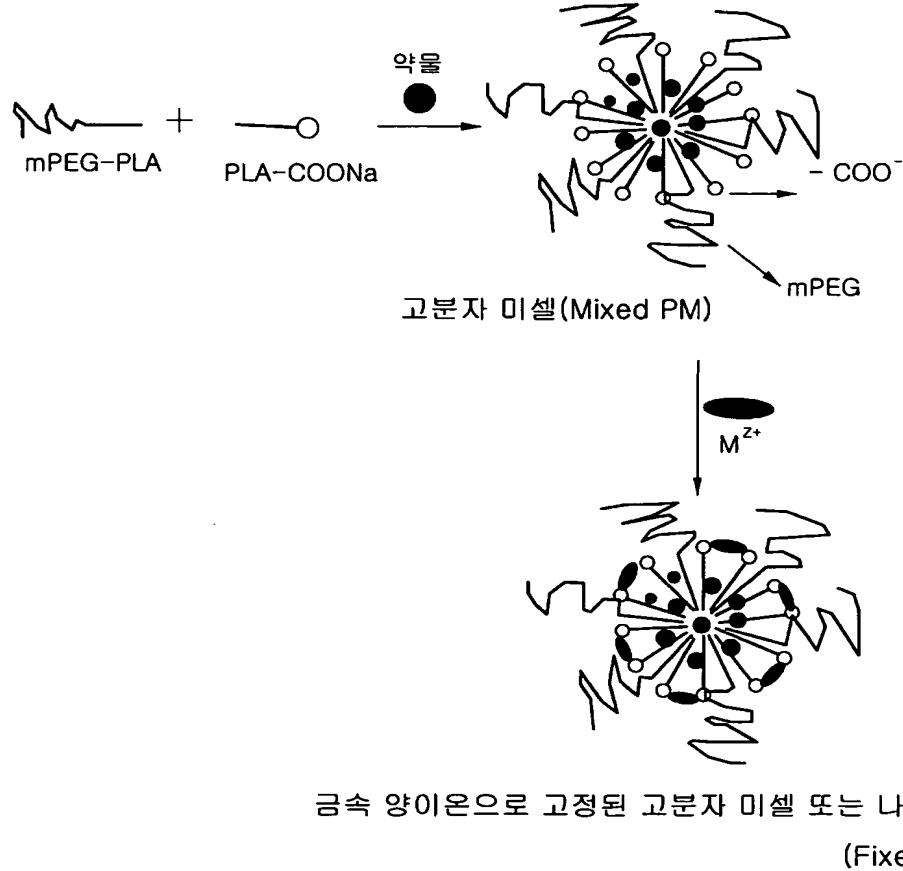
제 20항에 있어서, 상기 유기 용매가 아세톤, 에탄올, 메탄올, 아세트산 에틸, 아세트니트릴, 메틸렌클로라이드, 클로로포름, 아세트산 및 다이옥산으로 이루어진 그룹 중에서 하나 또는 그 이상으로 선택된 것을 특징으로 하는 난용성 약물을 포함하는 약학적 조성물제조방법.

도면

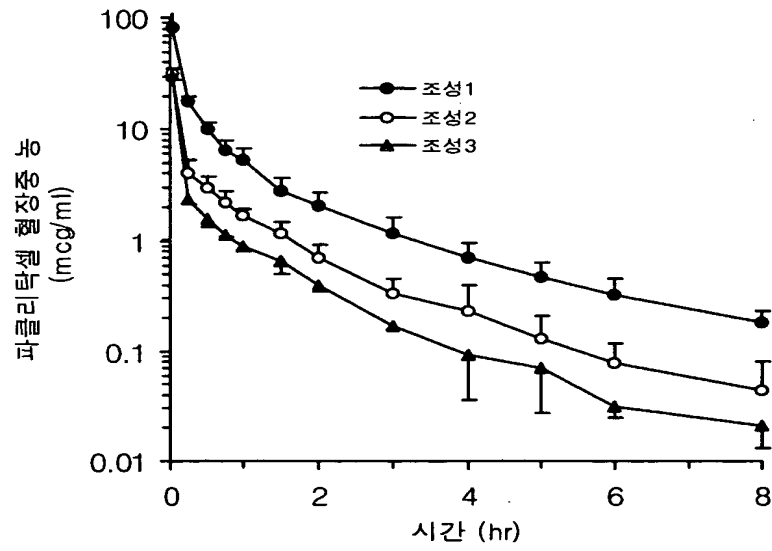
도면1



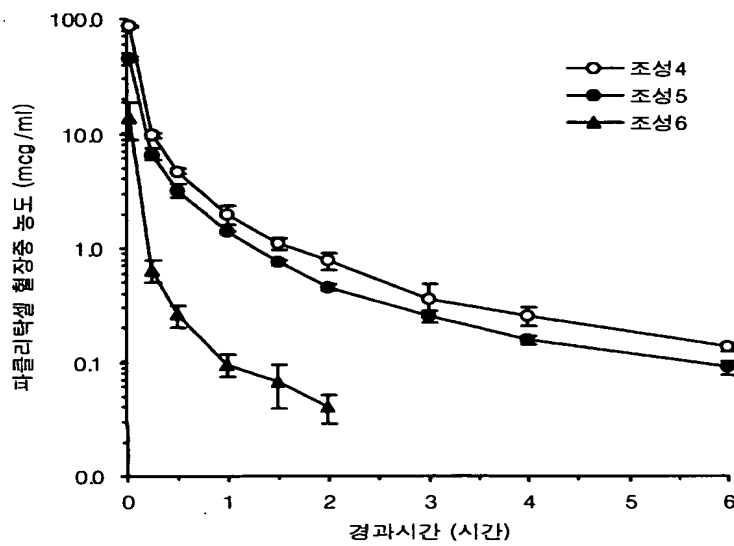
도면2



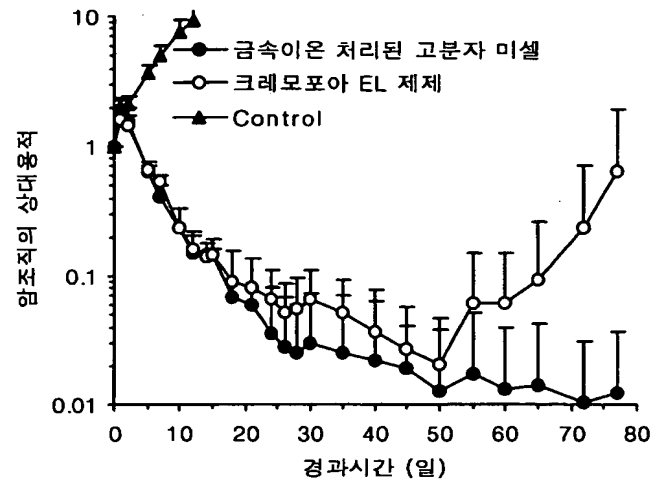
도면3



도면4



도면5a



도면5b

